

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 04-094679

(43)Date of publication of application : 26.03.1992

(51)Int.Cl.

C12M 3/00

C12N 5/06

C12N 11/00

(21)Application number : 02-210885

(71)Applicant : KAO CORP
TOKYO JIYOSHI IKA UNIV

(22)Date of filing : 08.08.1990

(72)Inventor : OKANO MITSUO
YAMADA NORIKO
SAKURAI YASUHISA
SAKAI HIDEAKI
NAKAMURA KOICHI

(54) CELL CULTURE SUPPORTER MATERIAL

(57)Abstract:

PURPOSE: To provide the subject material capable of culturing and recovering cells in simple processes without the contamination of impurities and without deteriorating the functions of the cells by coating the surface of a cell-adhesive substrate with a specific homo(co)polymer preferably in a specified pattern.

CONSTITUTION: The surface of a cell-adhesive substrate such as a petri dish shape substrate prepared by subjecting modified glass, polystyrene, etc., if necessary, to an ozone treatment, etc., is coated with a homopolymer or copolymer [e.g. acrylamide homo(co)polymer] having a critical dissolution temperature of 0-80° C in water preferably in a pattern such as a pattern having lines and spaces or a polka dot pattern in a total coverage degree of 5-90% to provide the objective material.

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

平4-94679

⑤ Int. Cl.⁵

C 12 M 3/00
C 12 N 5/06
11/00

識別記号

Z

庁内整理番号

8717-4B

④ 公開 平成4年(1992)3月26日

2121-4B

7236-4B

C 12 N 5/00

E

審査請求 未請求 請求項の数 2 (全10頁)

⑭ 発明の名称 細胞培養支持体材料

⑰ 特 願 平2-210885

⑱ 出 願 平2(1990)8月8日

⑲ 発 明 者 岡 野 光 夫 千葉県市川市国府台6-12-12
⑲ 発 明 者 山 田 則 子 東京都板橋区前野町6-10 前野町ハイッ1-601
⑲ 発 明 者 桜 井 靖 久 東京都杉並区永福3-17-6
⑲ 発 明 者 坂 井 秀 昭 和歌山県那賀郡岩出町畑毛310-3 フレグランス畑毛210
⑲ 発 明 者 中 村 浩 一 和歌山県和歌山市園部1030-15
⑲ 出 願 人 花 王 株 式 会 社 東京都中央区日本橋茅場町1丁目14番10号
⑲ 出 願 人 学校法人東京女子医科 東京都新宿区河田町8-1
大学
⑲ 代 理 人 弁理士 青 山 葆 外2名

明 細 書

1. 発明の名称

細胞培養支持体材料

2. 特許請求の範囲

(1) 細胞付着性基材表面上に、水に対する臨界溶解温度が0~80℃の範囲にあるホモポリマーもしくはコポリマーを被覆してなり、その総被覆率が5~90%である細胞培養支持体材料。

(2) 細胞付着性基材表面上に、該ホモポリマーもしくはコポリマーが、規則的、或は不規則的な微細なパターンとして被覆している請求記1載の細胞培養支持体材料。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、生化学、医学および免疫学等における細胞類の培養用支持体材料に関するものである。

(従来技術)

従来、細胞培養は、ガラス表面上あるいは種々の処理を行った合成高分子材料の表面上にて行われていた。例えば、ポリスチレンを材料とする表

面処理(例えば、γ線照射、シリコンコーティング等)を行った種々の容器が細胞培養用容器として普及している。従来、このような細胞培養用容器を用いて培養・増殖した細胞は、トリプシンのような蛋白分解酵素や化学薬品により処理することで容器表面から剥離・回収されていた。しかしながら、上述のような処理を施して増殖した細胞を回収する場合、①処理工程が煩雑になり、不純物混入の可能性が多くなること、②増殖した細胞が上記処理により変性し、細胞本来の機能が損なわれる例があること、等の欠点が指摘されている。

(発明が解決しようとする課題)

本発明は、上記のような問題を解決するためになされたものであり、トリプシン、EDTAのような蛋白分解酵素や化学薬品による処理を施さずに、環境温度を変化させることで、培養・増殖させた細胞を支持体表面から剥離・回収することが可能となるような細胞培養に使用する材料を提供することを目的とする。

(課題を解決するための手段)

本研究者は、以上のような点に鑑み、鋭意研究を重ねた結果、細胞支持体表面を特定の水溶性高分子、即ち、臨界溶解温度(水にある物質を混合するとき、ある温度では部分的にしか溶けないため2層に分離しているが、温度を上げるかまたは下げて、ある一定の温度を過ぎると完全に溶解して1層になることがある。温度を上げて完全溶解に達する場合の温度を上限臨界溶解温度、温度を下げて完全に溶解する場合の温度を下限臨界溶解温度という。)を示すようなポリマーにより処理することにより、細胞培養終了後、温度を変化させるだけで増殖細胞を回収することが可能であり、しかもこの現象は細胞を培養した培養液中においても可能であることを見出した。さらにその剥離した細胞は集合状態を保持していることも見出した。

即ち、本発明は細胞付着性基材表面上に、水に対する臨界溶解温度が0～80℃の範囲にあるホモポリマーもしくはコポリマーを被覆してなり、その総被覆率が5～90%である細胞培養支持体

好ましくない。

本発明に用いるホモポリマーまたはコポリマーは、以下のモノマーの重合または共重合により得られる。使用し得るモノマーは、これらの化合物に限定されるものではないが、例えば、アクリルアミド、メタクリルアミドなどの(メタ)アクリルアミド化合物、N-エチルアクリルアミド(単体重合体の下限臨界溶解温度72℃)、N-n-プロピルアクリルアミド(同21℃)、N-n-プロピルメタクリルアミド(同27℃)、N-イソプロピルアクリルアミド(同32℃)、N-イソプロピルメタクリルアミド(同43℃)、N-シクロプロピルアクリルアミド(同45℃)、N-シクロプロピルメタクリルアミド(同60℃)、N-エトキシエチルアクリルアミド(同約35℃)、N-エトキシエチルメタクリルアミド(同約45℃)、N-テトラヒドロフルフリルアクリルアミド(同約28℃)、N-テトラヒドロフルフリルメタクリルアミド(同約35℃)等のN-アルキル置換(メタ)アクリルアミド誘導体、N,N-ジメチル(メタ)アクリル

材料を提供するものである。

水に対する臨界溶解温度は、通常、水(イオン交換水または蒸留水)との溶解相図を作成して求める。水との溶解相図は臨界溶解温度を求めるポリマーの種々の濃度(重量分率、容積分率、モル分率、モル比等いずれの単位を用いても構わない。)の水溶液を調製し、各々の温度を上下させ、①目視により2相分離を確認する方法の他、②臨界タンパク光の観測による方法、③散乱光強度の観測による方法、④透過光レーザー光の観測による方法、等一般に知られている方法のいずれかを用いて、また、組み合わせて用いて作成される。

被覆に用いられる物質は水溶液中で臨界溶解温度を有する化合物であればすべて用いることができるが、好ましくは0～80℃、より好ましくは0～50℃の臨界溶解温度を有するものである。臨界溶解温度が80℃を越えると細胞が死滅する可能性があるため好ましくない。また、臨界溶解温度が0℃より低いと一般に細胞増殖速度が極度に低下するか、または細胞が死滅してしまうため

アミド、N-エチル-N-メチルアクリルアミド(単体重合体の下限臨界溶解温度56℃)、N,N-ジエチルアクリルアミド(同32℃)等のN,N-ジアルキル置換(メタ)アクリルアミド誘導体、さらに、N-アクリロイルピロリジン(単体重合体の下限臨界溶解温度56℃)、N-アクリロイルピペリジン(同約6℃)等を代表とする1-(1-オキソ-2-プロベニル)-ピロリジン類、1-(1-オキソ-2-プロベニル)-ピペリジン類、4-(1-オキソ-2-プロベニル)-モルホリン、1-(1-オキソ-2-メチル-2-プロベニル)-ピロリジン、1-(1-オキソ-2-メチル-2-プロベニル)-ピペリジン、4-(1-オキソ-2-メチル-2-プロベニル)-モルホリン等の環状基を有する(メタ)アクリルアミド誘導体、メチルビニルエーテル(単体重合体の下限臨界溶解温度35℃)等のビニルエーテル誘導体等である。また、増殖細胞の種類によって臨界溶解温度を調節する必要がある場合や、被覆物質と細胞培養支持体との相互作用を高める必要が生じた場合

や、細胞支持体の親水、疎水性のバランスを調整する場合などに、上記以外のモノマー類との共重合体、ポリマー同士のグラフトまたはブロック共重合体、あるいはホモポリマー、コポリマーの混合物を用いてもよい。また、ポリマー本来の性質が損なわれない範囲で架橋することも可能である。

被覆を施される細胞付着性基材は細胞が付着する材質ならばいずれでも良く、その材質としては通常細胞培養に用いられるガラス、改質ガラス、ポリスチレン、ポリメチルメタクリレート等の高分子化合物、あるいはセラミックス、金属等が挙げられる。その際、基材表面はオゾン処理、プラズマ処理、スパッタリング等の処理技術を用いて親水化を施されたものでも良い。形状は、ペトリディッシュに限定されることはなく、プレート、ファイバー、(多孔質)粒子、また、一般に細胞培養等に用いられる容器の形状(フラスコ等)を付与されていても構わない。

本発明においては、このような細胞付着性基材表面上に、上記0～80℃の臨界溶解温度を有す

るホモポリマーもしくはコポリマーを被覆するが、その被覆とは基材表面を上部から観察して、被覆されている部分の総面積が付着性基材表面総面積の5～90%に相当するものであり、細胞の剥離性を考えると10～70%が好ましい。被覆部分を上部から観察して、その形態は何ら限定されるものではないが、例えば、ラインとスペースからなるパターン、水玉模様状のパターン、格子状のパターン、その他特殊な形のパターン、あるいはこれらが混ざっている状態等の微細なパターンが好ましい。また、その被覆部の大きさ、さらに横から見た形は何ら限定されるものではない。さらに、その被覆部分と非被覆部分の配置は規則的であっても、不規則的であっても良いが、その2者は微細に分散されていることが好ましい。

被覆率は、X線光電子分光法(XPS)による元素分析、被覆部もしくは非被覆部への染料や蛍光物質の染色による分析、さらに接触角測定等による表面分析を単独あるいは併用して求めることができる。

塗布、混練等の物理的吸着を用いる方法等があるがこれらに限られるわけではない。

本発明での微細に被覆する方法とは、例えば、①被覆時にマスクとなるものを置き非被覆部を設ける方法、②被覆物質を噴霧し部分的に被覆部を作成する方法、あるいは、③被覆物質をあらかじめ溶媒中に分散、あるいは乳化させ、これを塗布することで部分的に被覆部を作成する方法、④被覆物質をあらかじめ溶液状態にしておき、被覆時に溶媒の蒸発速度と重合速度をコントロールして部分的な被覆部を作成する方法、⑤被覆物質を細胞付着性基材上に部分的に結晶化させ、その結晶部を化学的な反応によって結合させ、部分的な被覆部を作成する方法、⑥被覆時に走査型電子ビーム等で代表されるような走査型機器を利用し部分的な被覆部を作成する方法、さらに、⑦被覆後に超音波等により洗浄し部分的な被覆部を作成する方法、⑧被覆物質をオフセット印刷し、部分的に被覆部を作成する方法、等を単独または併用する方法が挙げられるが、本発明は細胞付着性基材上

細胞付着性基材への被覆方法は、細胞付着性基材と上記被覆物質を①化学的な反応によって結合させる方法、②物理的な相互作用を利用する方法、を単独でまたは併用して行うことができる。被覆時にモノマーを用いて重合させる場合、そのモノマーは気体、液体、固体いずれの状態でも良い。また、ホモポリマー又はコポリマーを用いて被覆する場合、そのポリマーは、液体、固体状態のいずれの状態でも良い。これらのものを①化学的な反応によって結合させる場合、電子線照射(EB)、γ線照射、紫外線照射、プラズマ処理、コロナ処理、さらに細胞付着性基材と被覆材料が適当な反応性官能基を有する場合は、ラジカル反応、アニオン反応、カチオン反応等の一般に用いられる有機反応を用いることができる。②物理的な相互作用による方法としては、被覆材料自身または細胞付着性基材との相溶性の良いマトリックス(例えば細胞付着性基材を形成する主モノマー、またはこれと相溶性の良いモノマーと被覆材料とのグラフトポリマー、ブロックポリマー等)を媒体とし、

に被覆部と非被覆部とが上記割合で存在していればその方法は何ら制限されるものではない。

また、細胞支持体上に培養した細胞を支持体から剥離させ回収するには、上限臨界溶解温度以上もしくは下限臨界溶解温度以下にするだけで良く、細胞を培養していた培養液においてもその他の等張液においても可能であり、目的に合わせて選択することができる。

本発明の細胞培養支持体材料によれば、細胞増殖時には、細胞は非被覆部である細胞付着性基材上に接着し、増殖をする。細胞剥離時には、被覆部である臨界溶解温度が0～80℃の範囲にあるホモポリマーもしくはコポリマーにおいて水分子の占める体積分率が上昇するため細胞は剥離することになる。

本発明の作用をポリ-N-イソプロピルアクリルアミドを例にとって説明する。ポリ-N-イソプロピルアクリルアミドは水溶液中で約32℃以下臨界溶解温度を有することが知られている。例えば、一般に細胞培養用ペトリディッシュ材料

することが可能である。

この方法によれば、トリプシン、EDTAのような蛋白分解酵素、化学薬品による処理を経ずに細胞培養支持体から培養した細胞を剥離・回収することができるので、①処理工程が簡略化される、②不純物等の混入の可能性が完全になくなる、③増殖した細胞が化学的処理により細胞膜が障害され細胞本来の機能が損なわれることがない、④剥離した細胞が集合状態を保持している等の顕著な特徴を獲得することが可能である。

(実施例)

以下、本発明を実施例により説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

実施例1、2、3、4

細胞培養支持体基材として、ベクトン・ディキンソン・ラブウェア(Becton Dickinson Labware)社製ファルコン(FALCON)3002ペトリディッシュを用い、培養する細胞としては、ウシ大動脈血管内皮細胞を採用した。N-イソプロピルアクリルアミド(モノマー又はポリマー)を表-1に

として用いられるポリスチレン上でN-イソプロピルアクリルアミドを電子線照射(EB)により重合を行うと、下限臨界溶解温度である32℃以上ではポリ-N-イソプロピルアクリルアミドの占有体積は小さくなり、ポリマー中の水分子を排除するため、支持体表面は疎水性を示し、逆に32℃以下ではポリ-N-イソプロピルアクリルアミドの占有体積は大きくなるのでポリマー中の水分子の占める体積分率が上昇するため、支持体表面は親水性を示すようになる。

通常の細胞培養では、トリプシン、EDTA等の蛋白分解酵素、化学薬品で処理することにより培養・増殖後の細胞を支持体表面から剥離・回収するが、上述したような物性を有するポリ-N-イソプロピルアクリルアミドを表面コーティングされた支持体では、温度を制御することにより支持体表面の親水・疎水性がコントロールでき細胞の細胞支持体への接着性が変化する。そのため、温度を変化させるだけで培養・増殖後の細胞を破壊することなく細胞支持体から容易に剥離、回収

示す濃度で、イソプロピルアルコールに溶解して、ペトリディッシュに0.35ml添加後、各々表-1に示すマスク(ステンレス製網)を用い、電子線を照射することにより、ペトリディッシュ表面にポリ-N-イソプロピルアクリルアミドを微細なパターンとして被覆した。電子線照射終了後、イオン交換水によりペトリディッシュを洗浄し、残存モノマーおよびペトリディッシュ表面に結合していないポリ-N-イソプロピルアクリルアミドを取り除き、クリーンベンチ内で乾燥して、細胞培養支持体を得た。

得られた細胞培養支持体表面上の被覆率は、X線光電子分光法(XPS)を用い、入射角30度の分析値より下式に従って求めた。得られた結果を表-2に示す。

$$\text{被覆率(\%)} = \frac{\text{被覆後のN\%}}{\text{被覆前のN\%}} \times 100$$

また、得られた細胞培養支持体材料は、細胞培養前にエチレンオキシドガスで滅菌し、十分に脱気した。

ウシ大動脈血管内皮細胞の培養は、得られた細胞支持体上にて、ウシ胎児血清(FCS)を10%含むダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)を培地として、5%二酸化炭素中、37℃で行った。十分、細胞が増殖したのを確認後、5℃に冷却し、放置して、附着培養細胞を剥離させ、増殖細胞剥離回収率を下式に従って求めた。結果を表-2に示す。

$$\text{増殖細胞剥離回収率(\%)} = \frac{\text{剥離、回収した細胞総数}}{\text{増殖させた細胞総数}} \times 100$$

実施例5、6

被覆物質としてN-イソプロピルアクリルアミドの代わりに、N,N-ジエチルアクリルアミドを使用する点以外は、実施例1、2と同様にして、細胞培養支持体を得、被覆率を求め、さらに、細胞培養し、これを剥離、回収し、増殖細胞剥離回収率を求めた。結果を表-2に示す。

比較例1

細胞培養支持体として、ペクトン・ディキンソ

ン・ラブウェア社製ファルコン3002 ペトリディッシュを用い、表面処理を全く行わずに、実施例と同様の実験を行った。結果を表-2に示す。

比較例2

細胞培養支持体として、細胞附着性のないペクトン・ディキンソン・ラブウェア社製、一般細菌用ファルコン1007 ペトリディッシュを用い、表面処理を全く行わずに、実施例と同様の実験を行った。結果を表-2に示す。

比較例3、4

細胞培養用支持体として、細胞附着性のないペクトン・ディキンソン・ラブウェア社製、一般細菌用ファルコン1007 ペトリディッシュを用い、実施例1、2と同様にして、細胞培養支持体を得、被覆率を求め、さらに、細胞培養し、これを剥離、回収し、増殖細胞剥離回収率を求めた。結果を表-2に示す。

比較例5

細胞培養用支持体として、ペクトン・ディキンソン・ラブウェア社製 ファルコン3002 ペ

トリディッシュを用い、被覆物質として、N-イソプロピルアクリルアミドさらに、架橋剤として、N,N-メチレンビスアクリルアミド(対N-イソプロピルアクリルアミド0.5wt%)を用い、マスクを用いずに電子線を照射することにより支持体表面全体にポリマーを被覆し、細胞支持体を得、被覆率を求め、さらに、細胞培養し、これを剥離、回収し、増殖細胞剥離回収率を求めた。結果を表-2に示す。

表-1

	モノマーもしくは ポリマーの濃度	使用したマスク (ステンレス製網)	電子線 照射量(Mrad)
実施例1	N-イソプロピル アクリルアミド モノマー 40wt%	100メッシュ	20
実施例2	N-イソプロピル アクリルアミド モノマー 40wt%	440メッシュ	20
実施例3	N-イソプロピル アクリルアミド モノマー 20wt%	75メッシュ	20
実施例4	N-イソプロピル アクリルアミド ポリマー 20wt%	100メッシュ	15
実施例5	N,N-ジエチル アクリルアミド モノマー 40wt%	100メッシュ	20
実施例6	N,N-ジエチル アクリルアミド モノマー 40wt%	440メッシュ	20
比較例1	使用せず	使用せず	0
比較例2	使用せず	使用せず	0
比較例3	N-イソプロピル アクリルアミド モノマー 40wt%	100メッシュ	20
比較例4	N-イソプロピル アクリルアミド モノマー 40wt%	440メッシュ	20
比較例5	N-イソプロピル アクリルアミド モノマー 40wt% + N,N-メチレン ビスアクリルアミド	使用せず	20

表-2

	被覆率(%)	増殖細胞剥離回収率(%)
実施例1	65	>90
実施例2	53	>90
実施例3	60	>90
実施例4	35	>90
実施例5	67	>90
実施例6	54	>90
比較例1	0	全く剥離せず(回収不可能)
比較例2	0	[細胞が付着/増殖せず]
比較例3	64	[細胞が付着/増殖せず]
比較例4	51	[細胞が付着/増殖せず]
比較例5	94	[細胞が付着/増殖せず]

なお、実施例、比較例とも支持体の親・疎水性を調べるために、フェース(FACE)接触角計(CAD型)[協和界面科学株式会社製]および付属品として、三懸系測定装置を用い液滴法で接触角を測定した。結果を表-3に示す。

ており、これは、微細なパターンとして被覆されたポリN-イソプロピルアクリルアミドまたはポリN,N-ジエチルアクリルアミドにより、支持体材料表面が疎水性から親水性へと変化していることを示している。このような材料を使用した実施例1、2、3、4、5、6の場合、表-2に示されるように、温度を低下させると、付着細胞は、培養支持体から良好に剥離し、回収することが可能であった。

一方、比較例1のように、細胞付着性基材上に表面処理を施さない場合は、表-3に示されるように、周りの温度を下げても接触角はほとんど変化せず、支持体材料表面は疎水性のままであった。この支持体材料では、表-2に示されるように、温度を低下させても付着細胞の剥離現象は観察されなかった。

また、比較例2のように、細胞付着性の認められない基材を用いた場合、表-2に示すように、細胞は付着/増殖ともに認められず、また、この表面に比較例3、4のように、実施例1、2と同

表-3

	37℃における接触角(度)	5℃における接触角(度)
実施例1	41	24
実施例2	47	29
実施例3	42	26
実施例4	49	33
実施例5	42	24
実施例6	45	26
比較例1	57	64
比較例2	85	87
比較例3	67	70
比較例4	70	71
比較例5	39	20

以上の実施例および比較例の結果より、細胞付着性基材表面上にN-イソプロピルアクリルアミドまたはN,N-ジエチルアクリルアミドで表面処理を行った実施例1、2、3、4、5、6では、表-3に示されるように、支持体材料周囲の温度を37℃から5℃に下げることによって接触角が減少し

様にポリマーを被覆しても、細胞の付着は認められなかった。

さらに、比較例5のように、細胞付着性基材表面全体に、ポリマーを被覆した場合においても、表-2で示す通り、細胞は付着しなかった。

実施例7

細胞培養支持体基材として、ベクトン・ディキンソン・ラブウェア社製 ファルコン3002ベトリディッシュを用い、その表面に、N-イソプロピルアクリルアミド30wt%イソプロピルアルコール溶液を0.1ml噴霧後、20Mradの電子線を照射し、ベトリディッシュ表面にポリN-イソプロピルアクリルアミドを微細なパターンとして被覆した。後の操作は、実施例1、2、3、4、5、6と同様に細胞培養支持体を得、被覆率、接触角を求め、さらに細胞を培養、これを剥離、回収して、増殖細胞剥離回収率を求めた。結果を表-4に示す。

実施例8

被覆物質として、N-イソプロピルアクリルア

ミドの代わりに、N-n-プロピルアクリルアミドを使用する点以外は、実施例7と同様に細胞支持体を得、被覆率、接触角を求め、さらに細胞を培養し、これを剥離、回収して増殖細胞剥離回収率を求めた。結果を表-4に示す。

実施例9

細胞培養支持体基材として、ベクトン・ディキンソン・ラブウェア社製 ファルコン3002 ペトリディッシュを用い、その表面に、N-イソプロピルアクリルアミド結晶微粉末10g(平均粒径10 μ)をヘキサン50g中に分散させ、その懸濁液をペトリディッシュに0.1ml添加後、15 Mradの電子線を照射し、ペトリディッシュ表面にポリ-N-イソプロピルアクリルアミドを微細なパターンとして被覆した。後の操作は、実施例1、2、3、4、5、6と同様に細胞培養支持体を得、被覆率、接触角を求め、さらに細胞を培養し、これを剥離、回収して、増殖細胞剥離回収率を求めた。結果を表-4に示す。

実施例10

シュ表面に結合していないポリ-N-イソプロピルアクリルアミドを取り除き、クリーンベンチ内で乾燥することによりポリ-N-イソプロピルアクリルアミドが微細なパターンとして被覆した細胞培養支持体を得た。後の操作は、実施例1、2、3、4、5、6と同様に、被覆率、接触角を求め、さらに細胞を培養し、これを剥離、回収して、増殖細胞剥離回収率を求めた。結果を表-4に示す。

実施例12

被覆物質として、N-イソプロピルアクリルアミドの代わりに、N-エトキシエチルアクリルアミドを使用する点以外は、実施例11と同様に、細胞支持体を得、被覆率、接触角を求め、さらに細胞を培養し、これを剥離、回収して増殖細胞剥離回収率を求めた。結果を表-4に示す。

実施例13

細胞培養支持体基材として、ベクトン・ディキンソン・ラブウェア社製 ファルコン3002 ペトリディッシュを用い、その表面に、N-イソプロピルアクリルアミド50wt%イソプロピルア

被覆物質として、N-イソプロピルアクリルアミドの代わりに、N-イソプロピルメタクリルアミドを使用する点以外は、実施例9と同様に細胞支持体を得、被覆率、接触角を求めた。次にこのものに対しては45℃で細胞を培養し、以下は実施例9と同様にこれを剥離、回収して、増殖細胞剥離回収率を求めた。結果を表-4に示す。

実施例11

細胞培養支持体基材として、ベクトン・ディキンソン・ラブウェア社製 ファルコン3002 ペトリディッシュを用い、その表面に、N-イソプロピルアクリルアミド55wt%イソプロピルアルコール溶液を0.35ml添加後、25 Mradの電子線を照射する。その際、照射部付近の温度を40℃とし、さらにその部分へ窒素ガスを毎時9m³導入した。イソプロピルアルコール溶液は、照射中に突沸し、ペトリディッシュの表面は見かけ上、ポリ-N-イソプロピルアクリルアミドが発泡、乾燥した状態で得られた。その後、イオン交換水により、洗浄し、残存モノマーおよびペトリディッ

ルアルコール溶液を0.1ml添加後、26℃クリーンベンチ内で40分間放置し、溶解しているN-イソプロピルアクリルアミドを部分的に結晶析出させた後、15 Mradの電子線を照射し、ペトリディッシュ表面にポリ-N-イソプロピルアクリルアミドを微細なパターンとして被覆した。後の操作は、実施例1、2、3、4、5、6と同様に、細胞培養支持体を得、被覆率、接触角を求め、さらに細胞を培養し、これを剥離、回収して、増殖細胞剥離回収率を求めた。結果を表-4に示す。

比較例6

クリーンベンチ内の放置時間を4時間とし、ペトリディッシュ表面全体に、N-イソプロピルアクリルアミドを結晶析出させる点以外は、実施例13と同様に、ペトリディッシュ表面全体にポリ-N-イソプロピルアクリルアミドが被覆された細胞培養支持体を得、被覆率、接触角を求め、さらに細胞を培養し、これを剥離、回収して、増殖細胞剥離回収率を求めた。結果を表-4に示す。

実施例 14

細胞培養支持体基材として、ペクトン・ディキンソン・ラブウェア社製 ファルコン 3002 ベトリディッシュを用い、その表面にN-イソプロピルアクリルアミド 4.5 wt% イソプロピルアルコール溶液を 0.2 ml 添加後、20 Mrad 電子線を照射し、その後、イオン交換水中で超音波洗浄を 30 分間行い、残存モノマーおよびベトリディッシュ表面に結合していない、ポリ-N-イソプロピルアクリルアミドを取り除き、クリーンベンチ内で乾燥することにより、ポリ-N-イソプロピルアクリルアミドが微細なパターンとして被覆した細胞培養支持体を得た。後の操作は、実施例 1、2、3、4、5、6 と同様に、被覆率、接触角を求め、さらに、細胞を培養し、これを剥離、回収して、増殖細胞剥離回収率を求めた。結果を表-4 に示す。

実施例 15

細胞培養支持体基材として、ペクトン・ディキンソン・ラブウェア社製 ファルコン 3002

ベトリディッシュを用い、その表面に、N-イソプロピルアクリルアミド 20 wt% イソプロピルアルコール溶液をオフセット印刷し、20 Mrad の電子線を照射し、ベトリディッシュ表面にポリ-N-イソプロピルアクリルアミドを微細なパターンとして被覆した。後の操作は、実施例 1、2、3、4、5、6 と同様に細胞培養支持体を得、被覆率、接触角を求め、さらに、細胞を培養し、これを剥離、回収して、増殖細胞剥離回収率を求めた。結果を表-4 に示す。

表-4

	被覆率 (%)	接触角(度)		増殖細胞剥離 回収率(%)
		37℃	5℃	
実施例 7	32	49	32	>90
実施例 8	36	49	34	>90
実施例 9	68	39	24	>90
実施例 10	67	40 (45℃)	23	>90
実施例 11	57	45	27	>90
実施例 12	55	47	29	>90
実施例 13	60	43	25	>90
実施例 14	42	48	28	>90
実施例 15	31	50	33	>90
比較例 6	95	38	20	細胞が付着/ 増殖せず

実施例 7 から 15 の結果より、ベトリディッシュ表面上に非被覆部として細胞付着性基材部分が微細なパターン状に存在していれば、増殖細胞剥離回収率は 90 % 以上の値が得られ、この現象を実現するための方法は、いずれの方法によっても可

能であることが分かる。

また、比較例 6 においては、比較例 5 と同様、細胞付着性基材上に被覆されているものの、ポリ-N-イソプロピルアクリルアミドがベトリディッシュ表面上を 95 % 被覆しているため、細胞は付着せず増殖も認められなかった。

実施例 16

実施例 1 で得られた剥離細胞の損傷度合を確認するため、これを遠心分離(600 G、5 分)により回収し、得られた 2×10^4 個の細胞をペクトン・ディキンソン・ラブウェア社製 ファルコン 3002 ベトリディッシュ上で再び培養させた。細胞の培養は実施例 1 と同様の方法を採用した。結果を表-5 に示す。

比較例 7

比較例 1 で培養した付着細胞を 0.05 % トリプシン-0.02 % EDTA 処理し、剥離させた細胞の損傷度合を確認するため、これを遠心分離(600 G、5 分)することにより回収し、得られた 2×10^4 個の細胞をペクトン・ディキンソン・

特開平4-94679(9)

手続補正書



平成 3 年 1 0 月 2 3 日

ラブウェア社製 ファルコン 3 0 0 2 ベトリディッシュ上で再び培養させた。培養は実施例 1 と同様の方法を採用した。結果を表-5 に示す。

表-5

	培養開始時の細胞数	4 日後の細胞数
実施例 16	2×10^5	2×10^5
比較例 7	2×10^5	1×10^5

実施例 1 6 と比較例 7 の結果から、剥離回収細胞の損傷度合については、表-5 に示すように、実施例 1 6 では培養開始時の 1 0 倍まで再増殖させることが可能であるが、比較例 7 では 5 倍までしか再増殖させることができなかった。このことは、本発明の剥離回収細胞は従来のそれよりも損傷度が小さいことを意味する。

(発明の効果)

本発明は、低温処理という簡便な操作で、不純物を全く混入させることなく、しかも、従来の方法と比較すると細胞機能を十分に保持しながら、培養・回収の繰り返し操作を行うことができる。

7. 補正の内容

(1)明細書第 3 1 頁下から第 6 行、「を意味する。」の後に

「実施例 1 7、1 8、1 9

細胞培養支持体基材として、ベクトン・ディキンソン・ラブウェア社製ファルコン 3 0 0 2 ベトリディッシュを用い、N-イソプロピルアクリルアミドを 4 0 wt% 濃度のイソプロピルアルコール溶液として、ベトリディッシュ上に 0. 1 ml 添加後、1 0 0 メッシュのマスク(ポリエステル製網)を用い、表-6 に示す電子線を照射することにより、ベトリディッシュ表面にポリ-N-イソプロピルアクリルアミドを微細なパターンとして被覆した。後の操作は、実施例 1、2、3、4、5、6 と同様に細胞培養支持体を得、被覆率、接触角を求め、さらに細胞を培養、これを剥離回収して、増殖細胞剥離回収率を求めた。結果を表-7 に示す。

実施例 2 0、2 1、2 2

細胞培養支持体基材として、ベクトン・ディキ

特許庁長官殿

1. 事件の表示

平成 2 年 特許願 第 2 1 0 8 8 5 号

2. 発明の名称

細胞培養支持体材料

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

名称 花王株式会社

(他 1 名)

4. 代理人

住所 〒540 大阪府大阪市中央区城見 2 丁目 1 番 6 1 号
ツイン 21 MID タワー内 電話 (06) 949-1261
FAX (06) 949-0361

氏名 弁理士 (6214) 青 山 茂



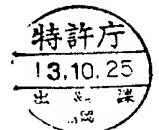
5. 補正命令の日付

自 発

6. 補正の対象

明細書の「発明の詳細な説明」の欄

方式変



ンソン・ラブウェア社製ファルコン 3 0 0 2 ベトリディッシュを用い、N-イソプロピルアクリルアミドを 4 0 wt% 濃度のイソプロピルアルコール溶液として、ベトリディッシュ上に 0. 1 ml 添加後、1 3 5 メッシュのマスク(ポリエステル製網)を用い、表-6 に示す電子線を照射することにより、ベトリディッシュ表面にポリ-N-イソプロピルアクリルアミドを微細なパターンとして被覆した。後の操作は、実施例 1、2、3、4、5、6 と同様に細胞培養支持体を得、被覆率、接触角を求め、さらに細胞を培養、これを剥離回収して、増殖細胞剥離回収率を求めた。結果を表-7 に示す。

表-6

	電子線照射線量 (Mrad)
実施例 1 7	1 5
実施例 1 8	2 0
実施例 1 9	2 5
実施例 2 0	1 5
実施例 2 1	2 0
実施例 2 2	2 5

表-7

	被覆率 (%)	接触角(度)		増殖細胞剥離 回収率(%)
		37℃	5℃	
実施例17	38	45	30	>90
実施例18	40	47	30	>90
実施例19	43	47	31	>90
実施例20	35	43	29	>90
実施例21	37	45	30	>90
実施例22	39	46	32	>90

を挿入する。

以 上